

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa AG

5 <120> Neue für das menE-Gen kodierende Nukleotidsequenzen

<130> 000551 BT

<140>

10 <141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 1570

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

20

<220>

<221> CDS

<222> (230)..(1357)

<223> menE-Gen

25

<400> 1

ttcgttgcca tagacatgct cttcgcagca ctgtttgcgc acgtctcctc cggcatcttt 60

gtcaccaaca atggttggga actcaccggc gcaatcggcg ctggcgcgct gcttctcatc 120

30

gcagttggcg caggtgcatg gagcatcgac ggggttctgg caaaacgcaa ggcctaaatc 180

tagcgccaca actccgaatt ctgaaccatc ggcactagaa tctcggaa atg aat act 238

35

Met Asn Thr

1

cgc gtc ctc gaa gca cta cct gtt gat ctt gca gat ccc acc gca att 286

Arg Val Leu Glu Ala Leu Pro Val Asp Leu Ala Asp Pro Thr Ala Ile

40

5

10

15

ctg gga gat ctc gag gac gca atc tct ggg aag aaa act ttc ctc ccc 334

Leu Gly Asp Leu Glu Asp Ala Ile Ser Gly Lys Lys Thr Phe Leu Pro

20

25

30

35

atc cct gta caa gat aaa acc cgt gca cag ttg ctg cgc gat tct caa 382

Ile Pro Val Gln Asp Lys Thr Arg Ala Gln Leu Leu Arg Asp Ser Gln

40

45

50

cga gtt ggc ctc gcc atc gat cct tcg atc gct ttg gtg atg gcc act 430

50

Arg Val Gly Leu Ala Ile Asp Pro Ser Ile Ala Leu Val Met Ala Thr

55

60

65

tct ggt tct aca ggt acc ccg aag ggc gct cag ctc act ccg ttg aat 478

55

Ser Gly Ser Thr Gly Thr Pro Lys Gly Ala Gln Leu Thr Pro Leu Asn

70

75

80

	ttg	gtg	agt	tcc	gcc	gat	gct	acg	cat	cag	ttt	tta	ggg	ggc	gaa	ggc	526
	Leu	Val	Ser	Ser	Ala	Asp	Ala	Thr	His	Gln	Phe	Leu	Gly	Gly	Glu	Gly	
		85					90					95					
5	cag	tgg	ttg	ctt	gcc	atg	cca	gca	cac	cac	att	gca	ggc	atg	cag	gtg	574
	Gln	Trp	Leu	Leu	Ala	Met	Pro	Ala	His	His	Ile	Ala	Gly	Met	Gln	Val	
	100					105					110					115	
10	ctt	ctt	cga	agc	ctc	att	gct	gga	gtt	gag	cca	cta	gct	att	gat	ctc	622
	Leu	Leu	Arg	Ser	Leu	Ile	Ala	Gly	Val	Glu	Pro	Leu	Ala	Ile	Asp	Leu	
					120					125					130		
15	agc	aca	ggg	ttt	cac	att	gac	gct	ttc	gca	ggc	gcc	gcg	gca	gaa	ctg	670
	Ser	Thr	Gly	Phe	His	Ile	Asp	Ala	Phe	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	Glu	Leu	
				135					140					145			
20	aaa	aat	acc	ggc	gac	cgc	gtc	tat	aca	tcc	ttg	act	cca	atg	cag	tta	718
	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	Arg	Val	Tyr	Thr	Ser	Leu	Thr	Pro	Met	Gln	Leu	
			150					155					160				
25	ctt	aaa	gca	atg	gac	tcc	ttg	caa	ggc	att	gaa	gcc	ctg	aaa	ctt	ttt	766
	Leu	Lys	Ala	Met	Asp	Ser	Leu	Gln	Gly	Ile	Glu	Ala	Leu	Lys	Leu	Phe	
		165					170					175					
30	gat	gtc	att	ctt	gtt	ggc	ggg	gct	gca	ttg	tct	aag	cag	gcc	cga	att	814
	Asp	Val	Ile	Leu	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Leu	Ser	Lys	Gln	Ala	Arg	Ile	
	180					185					190					195	
35	tct	gcg	gag	cag	cta	gac	atc	aac	att	gtc	acc	acc	tac	ggc	tcc	tca	862
	Ser	Ala	Glu	Gln	Leu	Asp	Ile	Asn	Ile	Val	Thr	Thr	Tyr	Gly	Ser	Ser	
					200					205					210		
40	gag	act	tca	ggg	ggc	tgc	gtt	tat	gat	ggc	aag	ccc	att	ccc	ggc	gcg	910
	Glu	Thr	Ser	Gly	Gly	Cys	Val	Tyr	Asp	Gly	Lys	Pro	Ile	Pro	Gly	Ala	
				215					220					225			
45	aaa	gtc	cgt	att	tgc	gat	gag	cgc	att	gag	ttg	ggg	ggc	ccg	atg	att	958
	Lys	Val	Arg	Ile	Ser	Asp	Glu	Arg	Ile	Glu	Leu	Gly	Gly	Pro	Met	Ile	
			230					235					240				
50	gcg	cag	ggc	tac	aga	aat	gca	cct	gaa	cat	ccg	gat	ttc	gcc	aac	gag	1006
	Ala	Gln	Gly	Tyr	Arg	Asn	Ala	Pro	Glu	His	Pro	Asp	Phe	Ala	Asn	Glu	
		245					250					255					
55	ggg	tgg	ttt	acc	acc	tct	gat	tca	ggg	gaa	ctc	cac	gac	ggg	att	ctc	1054
	Gly	Trp	Phe	Thr	Thr	Ser	Asp	Ser	Gly	Glu	Leu	His	Asp	Gly	Ile	Leu	
	260					265					270					275	
60	acc	gtg	act	ggg	cgc	gtg	gat	acc	gtc	att	gat	tcc	ggg	gga	ttg	aag	1102
	Thr	Val	Thr	Gly	Arg	Val	Asp	Thr	Val	Ile	Asp	Ser	Gly	Gly	Leu	Lys	
					280					285					290		
65	ttg	cac	cca	gag	gta	ctg	gaa	cgt	gcc	atc	gca	gat	att	aaa	ggg	gtc	1150
	Leu	His	Pro	Glu	Val	Leu	Glu	Arg	Ala	Ile	Ala	Asp	Ile	Lys	Gly	Val	
				295					300					305			
70	acc	gcg	gcg	tgt	gtt	gtg	ggg	att	ccc	gat	ccc	cga	tta	ggc	caa	gca	1198
	Thr	Ala	Ala	Cys	Val	Val	Gly	Ile	Pro	Asp	Pro	Arg	Leu	Gly	Gln	Ala	
			310					315					320				

att gtg gcc gcg tac tcc gga tcg atc agt ccg tct gaa gtt att gaa 1246
 Ile Val Ala Ala Tyr Ser Gly Ser Ile Ser Pro Ser Glu Val Ile Glu
 325 330 335

5

ggc ctc gac gat cta cct cgt tgg cag ctt ccc aaa cgg ctg aag cat 1294
 Gly Leu Asp Asp Leu Pro Arg Trp Gln Leu Pro Lys Arg Leu Lys His
 340 345 350 355

10

ctg gaa tct ttg ccc agc att ggt cct gga aaa gct gat cga cgt gct 1342
 Leu Glu Ser Leu Pro Ser Ile Gly Pro Gly Lys Ala Asp Arg Arg Ala
 360 365 370

15

atc gcg aag ctg ttt tagtcttcat tcttgctggc tgcaactagt tttgccacat 1397
 Ile Ala Lys Leu Phe
 375

cttcatcggt gtacactttg gcgatctgct catcatttcc acccatgagg gtgttgccaa 1457

20

caactagtgc tccactttgg gtggtgggca cgacagcgaa gtgtcggggc tgagcgtaga 1517
 cctggcgaat aggggtgatca gagcgcagtg cgcaggcatg cagccatacg tca 1570

25

<210> 2
 <211> 376
 <212> PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum

30

<400> 2
 Met Asn Thr Arg Val Leu Glu Ala Leu Pro Val Asp Leu Ala Asp Pro
 1 5 10 15

35

Thr Ala Ile Leu Gly Asp Leu Glu Asp Ala Ile Ser Gly Lys Lys Thr
 20 25 30

Phe Leu Pro Ile Pro Val Gln Asp Lys Thr Arg Ala Gln Leu Leu Arg
 35 40 45

40

Asp Ser Gln Arg Val Gly Leu Ala Ile Asp Pro Ser Ile Ala Leu Val
 50 55 60

Met Ala Thr Ser Gly Ser Thr Gly Thr Pro Lys Gly Ala Gln Leu Thr
 65 70 75 80

45

Pro Leu Asn Leu Val Ser Ser Ala Asp Ala Thr His Gln Phe Leu Gly
 85 90 95

50

Gly Glu Gly Gln Trp Leu Leu Ala Met Pro Ala His His Ile Ala Gly
 100 105 110

Met Gln Val Leu Leu Arg Ser Leu Ile Ala Gly Val Glu Pro Leu Ala
 115 120 125

55

Ile Asp Leu Ser Thr Gly Phe His Ile Asp Ala Phe Ala Gly Ala Ala
 130 135 140

Ala Glu Leu Lys Asn Thr Gly Asp Arg Val Tyr Thr Ser Leu Thr Pro
 145 150 155 160

Met Gln Leu Leu Lys Ala Met Asp Ser Leu Gln Gly Ile Glu Ala Leu
 165 170 175
 5 Lys Leu Phe Asp Val Ile Leu Val Gly Gly Ala Ala Leu Ser Lys Gln
 180 185 190
 Ala Arg Ile Ser Ala Glu Gln Leu Asp Ile Asn Ile Val Thr Thr Tyr
 195 200 205
 10 Gly Ser Ser Glu Thr Ser Gly Gly Cys Val Tyr Asp Gly Lys Pro Ile
 210 215 220
 Pro Gly Ala Lys Val Arg Ile Ser Asp Glu Arg Ile Glu Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Pro Met Ile Ala Gln Gly Tyr Arg Asn Ala Pro Glu His Pro Asp Phe
 245 250 255
 20 Ala Asn Glu Gly Trp Phe Thr Thr Ser Asp Ser Gly Glu Leu His Asp
 260 265 270
 Gly Ile Leu Thr Val Thr Gly Arg Val Asp Thr Val Ile Asp Ser Gly
 275 280 285
 25 Gly Leu Lys Leu His Pro Glu Val Leu Glu Arg Ala Ile Ala Asp Ile
 290 295 300
 Lys Gly Val Thr Ala Ala Cys Val Val Gly Ile Pro Asp Pro Arg Leu
 305 310 315 320
 Gly Gln Ala Ile Val Ala Ala Tyr Ser Gly Ser Ile Ser Pro Ser Glu
 325 330 335
 35 Val Ile Glu Gly Leu Asp Asp Leu Pro Arg Trp Gln Leu Pro Lys Arg
 340 345 350
 Leu Lys His Leu Glu Ser Leu Pro Ser Ile Gly Pro Gly Lys Ala Asp
 355 360 365
 40 Arg Arg Ala Ile Ala Lys Leu Phe
 370 375
 45
 <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum
 50
 <220>
 <223> Primer menE-int1
 <400> 3
 55 ctcactccgt tgaatttg

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

5 <223> Primer menE-int2

<400> 4

caggtgcatt tctgtagcc

19

10

Patentansprüche

1. Isoliertes Polynukleotid aus coryneformen Bakterien,
enthaltend eine für das menE-Gen kodierende
5 Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe
 - a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist
mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid
kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2
enthält,
 - 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das
eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens
70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ
ID No. 2,
 - 15 c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den
Polynukleotiden von a) oder b), und
 - d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15
aufeinanderfolgende Nukleotide der
Polynukleotidsequenz von a), b) oder c) ,

wobei das Polypeptid bevorzugt die Aktivität der O-
20 Succinylbenzoesäure-CoA-Ligase aufweist.
2. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
eine in coryneformen Bakterien replizierbare, bevorzugt
rekombinante DNA ist.
3. Polynukleotid gemäß Anspruch 1, wobei das Polynukleotid
25 eine RNA ist.
4. Polynukleotid gemäß Anspruch 2, enthaltend die
Nukleinsäuresequenz wie in SEQ ID No. 1 dargestellt.
5. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 2, enthaltend
 - (i) die Nukleotidsequenz, gezeigt in SEQ ID No. 1,
30 oder

- (ii) mindestens eine Sequenz, die der Sequenz (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Kodes entspricht, oder
- (iii) mindestens eine Sequenz, die mit der zur Sequenz (i) oder (ii) komplementären Sequenz hybridisiert, und gegebenenfalls
- (iv) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).
6. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 5, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß die Hybridisierung unter einer Stringenz entsprechend höchstens 2x SSC durchgeführt wird.
7. Polynukleotidsequenz gemäß Anspruch 1, die für ein Polypeptid kodiert, das die in SEQ ID No. 2 dargestellte Aminosäuresequenz enthält.
8. Coryneforme Bakterien, in denen das menE-Gen abgeschwächt, insbesondere ausgeschaltet wird.
9. Integrationsvektor pCR2.1menEint, der
- 9.1. ein 520 bp großes internes Fragment des menE-Gens trägt,
- 9.2. dessen Restriktionskarte in Figur 1 wiedergegeben wird, und
- 9.3. der in dem E. coli-Stamm Top10/pCR2.1menEint unter der Nr. DSM 14080 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen hinterlegt ist.
10. Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation der die gewünschte L-Aminosäure produzierenden coryneformen Bakterien, in denen man zumindest das menE-Gen oder dafür kodierende Nukleotidsequenzen abschwächt, insbesondere ausschaltet;
- b) Anreicherung der L-Aminosäure im Medium oder in den Zellen der Bakterien, und
- c) Isolieren der L-Aminosäure.
- 10 11. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges der gewünschten L-Aminosäure verstärkt.
- 15 12. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung der gewünschten L-Aminosäure verringern.
- 20 13. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man die Expression des (der) Polynukleotides (e), das (die) für das menE-Gen kodiert (kodieren) abschwächt, insbesondere ausschaltet.
- 25 14. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man die katalytischen Eigenschaften des Polypeptids (Enzymprotein) verringert, für das das Polynukleotid menE kodiert.
- 30 15. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe

- 15.1 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen dapA,
- 15.2 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat-
Dehydrogenase kodierende Gen gap,
- 5 15.3 das für die Triosephosphat-Isomerase kodierende
Gen tpi,
- 15.4 das für die 3-Phosphoglycerat-Kinase kodierende
Gen pgk,
- 10 15.5 das für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
kodierende Gen zwf,
- 15.6 das für die Pyruvat-Carboxylase kodierende Gen
pyc,
- 15.7 das für die Malat-Chinon-Oxidoreduktase
kodierende Gen mqo,
- 15 15.8 das für eine feed-back resistente
Aspartatkinase kodierende Gen lysC,
- 15.9 das für den Lysin-Export kodierende Gen lysE,
- 15.10 das für die Homoserin-Dehydrogenase kodierende
Gen hom,
- 20 15.11 das für die Threonin-Dehydratase kodierende Gen
ilvA oder das für eine feed back resistente
Threonin-Dehydratase kodierende Allel
ilvA(Fbr),
- 25 15.12 das für die Acetohydroxysäure-Synthase
kodierende Gen ilvBN,
- 15.13 das für die Dihydroxysäuredehydratase
kodierende Gen ilvD, und
- 15.14 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen zwa1

verstärkt bzw. überexprimiert.

16. Verfahren gemäß Anspruch 10, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man zur Herstellung
von L-Aminosäuren coryneforme Mikroorganismen
5 fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- 16.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende Gen pck,
- 16.2 das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase
10 kodierende Gen pgi,
- 16.3 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen
poxB, und
- 16.4 das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2
abschwächt.
- 15 17. Coryneforme Bakterien, die einen Vektor enthalten, der
Teile des Polynukleotids gemäß Anspruch 1, mindestens
aber 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der
beanspruchten Sequenz, trägt.
18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden
20 Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Mikroorganismen der Art Corynebacterium
glutamicum einsetzt.
19. Verfahren zum Auffinden von RNA, cDNA und DNA, um
Nukleinsäuren, beziehungsweise Polynukleotide oder Gene zu
25 isolieren, die für die O-Succinylbenzoesäure-CoA-Ligase
kodieren oder eine hohe Ähnlichkeit mit der Sequenz des
menE-Gens aufweisen, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, daß man das Polynukleotid,
enthaltend die Polynukleotidsequenzen gemäß den Ansprüchen
30 1, 2, 3 oder 4, als Hybridisierungs sonden einsetzt.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein isoliertes Polynukleotid enthaltend eine Polynukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe

- 5 a) Polynukleotid, das mindestens zu 70% identisch ist mit einem Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das die Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2 enthält,
- 10 b) Polynukleotid, das für ein Polypeptid kodiert, das eine Aminosäuresequenz enthält, die zu mindestens 70% identisch ist mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID No. 2,
- c) Polynukleotid, das komplementär ist zu den Polynukleotiden von a) oder b), und
- 15 d) Polynukleotid, enthaltend mindestens 15 aufeinanderfolgende Nukleotide der Polynukleotidsequenz von a), b) oder c),

- und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-
- 20 Aminosäuren unter Verwendung von coryneformen Bakterien, in denen zumindest das menE-Gen abgeschwächt vorliegt, und die Verwendung von Polynukleotiden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen enthalten, als Hybridisierungssonden.